

[Fig. 3] A drawing showing the comparison with time between Example 1 and the conventional method in the step of multiplying the metabolizing bacteria and the step of decomposing the organic chlorine compounds.

[Fig. 4] A conceptual showing the constitution of stratum-cleansing facilities for carrying out the method of the invention in Example 2.

[Fig. 6] A scheme showing the progress of the reaction of oxidation of methane.

[Fig. 7] A scheme showing the progress of the reaction of decomposition of TCE.

[Fig. 1]

14 Injecting well

Exhaust gas

18 Raising well

16 Observing well

Level of ground water

Stream of ground water

[Fig. 3]

Conventional method

Example of the Invention

Concentration of TEC

Step of multiplying the metabolizing bacteria

Step of decomposing organic chlorine compounds

Elapsed time

[Fig. 4]

34 Injecting well

38 Raising well

36 Observing well

Level of ground water

Stream of ground water

[Fig. 6]

[Fig. 7]

TEC epoxide

JP-A 9-234490 laid-opened September 9, 1997

Japanese Patent Application No. H08-73215 - March 4, 1996

Applicant: Japan Organo Co., Ltd.

[Title of Invention]

A method of cleansing a polluted stratum and ground water polluted with organic chlorine compounds

[Abstract]

[Problem]

To provide a method of efficiently cleansing a stratum and ground water polluted with organic chlorine compounds by bioremediation techniques.

[Solving means]

The method of the invention is a method of cleansing a polluted stratum and ground water polluted with organic chlorine compounds by lowering the concentration of the organic chlorine compounds in the stratum and ground water by use of methane-metabolizing bacteria for decomposing the organic chlorine compounds by a decomposing enzyme induced in the bacteria upon oxidation of a substrate such as methane. The present method comprises a measurement step of mixing a reagent with ground water collected from the polluted stratum and then oxidizing the reagent by the decomposing enzyme present in the ground water to measure the activity of the decomposing enzyme, wherein the supply of the substrate, oxygen and nutrition salts

for the metabolizing bacteria is regulated on the basis of the above activity of the decomposing enzyme determined in the measurement step.

[CLAIMS]

1. A method of cleansing a polluted stratum and ground water polluted with organic chlorine compounds by lowering the concentration of the organic chlorine compounds in the stratum and ground water by use of metabolizing bacteria selected from the group consisting of methane-metabolizing bacteria, toluene-metabolizing bacteria, phenol-metabolizing bacteria and ammonia-metabolizing bacteria for decomposing the organic chlorine compounds by a decomposing enzyme induced in the bacteria upon oxidation of methane, toluene, phenol or ammonia as the substrate,

said method comprising a measurement step of mixing a reagent with ground water collected from the polluted stratum and then oxidizing the reagent by the decomposing enzyme present in the ground water to measure the activity of the decomposing enzyme,

wherein the amounts of the substrate, oxygen and nutrition salts supplied to the metabolizing bacteria are regulated on the basis of the activity of the decomposing enzyme determined in the measurement step.

2. The method of cleansing a polluted stratum and ground water polluted with organic chlorine compounds according to claim

1, which comprises the step of multiplying the metabolizing bacteria in a polluted stratum by supplying oxygen, nutrition salts and the substrate necessary for multiplication of the metabolizing bacteria to the polluted stratum thereby inducing the decomposing enzyme, and after the step of multiplying the metabolizing bacteria, the step of decomposing the organic chlorine compounds by stopping the supply of the substrate, oxygen and nutrition salts to the polluted stratum, or by supplying the substrate, without stopping the supply of oxygen and nutrition salts, to the polluted stratum while regulating the concentration of the dissolved substrate in the ground water to be lower than the concentration of the dissolved substrate in the step of multiplying the metabolizing bacteria, in order to decompose the organic chlorine compounds by the decomposing enzyme induced in the metabolizing bacteria,

wherein the switching of from the step of multiplying the metabolizing bacteria to the step of decomposing the organic chlorine compounds is conducted on the basis of the activity of the decomposing enzyme determined in the measurement step.

3. The method of cleansing a polluted stratum and ground water polluted with organic chlorine compounds according to claim 1, which comprises the step of multiplying the metabolizing bacteria by supplying oxygen, nutrition salts and the substrate necessary for the metabolizing bacteria to a reactor to

multiply the metabolizing bacteria in a packed layer therein thereby inducing the decomposing enzyme, and after the step of multiplying the metabolizing bacteria, the step of decomposing the organic chlorine compounds by sending ground water drawn from the polluted stratum to the reactor and simultaneously stopping the supply of the substrate, oxygen and nutrition salts to the reactor, or supplying the substrate, without stopping the supply of oxygen and nutrition salts, to the reactor while regulating the concentration of the dissolved substrate in the reactor to be lower than the concentration of the dissolved substrate in the step of multiplying the metabolizing bacteria, in order to decompose the organic chlorine compounds in ground water sent to the reactor by the decomposing enzyme induced in the metabolizing bacteria,

wherein the switching of from the step of multiplying the metabolizing bacteria to the step of decomposing the organic chlorine compounds is conducted on the basis of the activity of the decomposing enzyme determined in the measurement step.

4. The method of cleansing a stratum and ground water polluted with organic chloride compounds according to any one of claims 1 to 3, wherein the methane-metabolizing bacteria are selected as the metabolizing bacteria, and in the measurement step, ground water collected from the polluted stratum is mixed with a reagent followed by oxidizing the reagent by the oxidizing

activity of a soluble methane monoxidase in the ground water to measure the oxidizing activity of the soluble methane monoxidase.

[Detailed Description of the Invention]

[Technical Field to Which the Invention Belongs]

The invention relates to a method of microbiologically cleansing a stratum polluted with organic chlorine compounds such as trichloroethylene etc. and ground water in said stratum and in particular to a method of rapidly and economically cleansing a stratum polluted with organic chlorine compounds and ground water in said stratum by in situ bioremediation techniques or bioreactor techniques.

[Prior Art]

Organic chlorine compounds such as trichloroethylene ( $C_2HCl_3$ , hereinafter abbreviated into TCE) and tetrachloroethylene ( $Cl_2C=CCl_2$ ) are highly soluble in fats and oils and thus used widely as general solvents, degreasing detergents etc. in various factories, laundries etc. Accordingly, considerable amounts of these organic chlorine compounds are discharged or erroneously flow out to the outside during use, to pollute stratum and ground water. Because there is the danger that these organic chlorine compounds are carcinogenic substances, there is a social great demand in recent years for cleansing polluted stratum and ground water therein. Accordingly, measures by various methods have been

taken to cleanse polluted stratum and ground water therein.

The cleansing methods carried out heretofore are mainly physicochemical methods such as an enclosure method of enclosing organic chlorine compounds in a certain region, a replacement method of excavating a polluted stratum and replacing it by non-polluted soil, an air-exposing method of drawing and raising ground water and exposing it to the air to release and diffuse organic chlorine compounds therefrom into the air, and a pump and treatment method involving a combination of gas extraction in vacuo and active-carbon adsorption. These physicochemical methods are effective against pollution with organic chlorine compounds at high concentrations, but because of enormous costs for facilities and operation, these methods are not economical for cleansing low-concentration pollution in a broad region, and because these methods are not techniques of rendering organic chlorine compounds harmless by decomposition, there is the problem of secondary pollution with the organic chlorine compounds recovered from the polluted stratum.

Accordingly, the treatment techniques of decomposing organic chlorine compounds by means of bacteria, particularly the in situ bioremediation techniques carried out in a polluted site or reactor-type bioremediation techniques of conducting microbial treatment in a treatment reactor, are under development. The method of cleansing a stratum and ground



water by in situ bioremediation refers to a method of cleansing a stratum and ground water wherein bacteria having an ability to decompose pollutants such as organic chlorine compounds are multiplied and activated in a stratum in a polluted site, and by the action of the bacteria, the pollutants are decomposed in situ, that is, in the stratum, thus converting them into harmless materials. The method of cleansing a stratum and ground water by reactor-type bioremediation is a cleansing method wherein in place of cleansing by microbiological decomposition of pollutants in the polluted stratum, cleansing is performed in a separately provided treatment reactor, that is, the bacteria having an ability to decompose pollutants are multiplied and activated in the reactor, and ground water raised from the polluted stratum is sent to the reactor where pollutants in the ground water are decomposed and rendered harmless by the action of the bacteria.

In the stratum, there are none of bacteria capable of directly metabolizing organic chlorine compounds, so that for microbiologically cleansing pollution with organic chlorine compounds, a treatment method of utilizing co-oxidation by bacteria metabolizing methane, toluene, phenol and ammonia respectively (referred to hereinafter as methane-metabolizing bacteria, toluene-metabolizing bacteria, phenol-metabolizing bacteria and ammonia-metabolizing bacteria) is investigated. In this method, environmentally relatively harmless methane,

toluene, phenol and ammonia are injected as substrates for the respective metabolizing bacteria such as methane-metabolizing bacteria etc., in addition to nutrition salts and oxygen necessary for multiplication of the metabolizing bacteria such as methane-metabolizing bacteria, are injected into the treatment reactor or polluted site, whereby the metabolizing bacteria are multiplied and decomposing enzymes decomposing organic chlorine compounds as their substrates are induced in the metabolizing bacteria. Then, the organic chlorine compounds are decomposed and converted into harmless materials by the induced decomposing enzymes.

In the in situ bioremediation method of utilizing co-oxidation by the metabolizing bacteria as described above, if substrates such as methane are coexistent at high concentrations with organic chlorine compounds in the polluted site, competitive inhibition by the substrates occurs thus significantly reducing the rate of decomposition of the pollutants. This also applies to the reactor-type bioremediation method.

Hereinafter, the in situ bioremediation method of utilizing methane metabolizing bacteria as one example is further described. In the process of oxidizing methane, the methane-metabolizing bacteria are known to induce two kinds of methane monoxidase, that is, soluble methane monooxygenase (abbreviated hereinafter to SMMO) for decomposing organic

chlorine compounds such as TCE and membrane-binding methane monoxidase (abbreviated hereinafter to pMMO) not contributing to decomposition of organic chlorine compounds. The oxidation reaction of methane by the methane-metabolizing bacteria proceeds at four stages of the oxidation reaction as shown in Fig. 6, and sMMO induced by the methane-metabolizing bacteria catalyzes the first-stage reaction of oxidizing methane to form methanol. When TCE is used as the substrate in place of methane in the first-stage reaction of oxidizing methane as shown in Fig. 6, the decomposition reaction of TCE by co-oxidation as shown in Fig. 7 occurs. This decomposition reaction of TCE does not occur at the second and subsequent stages in the oxidation reaction of methane in Fig. 6.

In the decomposition reaction of TCE catalyzed by sMMO, methane i.e. the original substrate and TCE i.e. a substrate for co-oxidation reaction act as mutually competitive inhibitors, and thus there is the problem that the decomposition reaction of TCE is inhibited competitively by a high concentration of methane. That is, if methane is present at high concentration, TCE is hardly decomposed, whereas if methane is deficient, the methane-metabolizing bacteria are not multiplied, neither is sMMO induced. Further, there is another problem that if the decomposition reaction of TCE by sMMO proceeds, trichloroethylene epoxide which is an intermediate in the decomposition reaction of TCE is

accumulated thereby inactivating the activity of SMMO.

Accordingly, the method of cleansing a stratum polluted with organic chlorine compounds by utilizing co-oxidation is carried out by dividing it into two stages, that is, a multiplication phase where nutrition salts, oxygen and substrates such as methane are injected to multiply the metabolizing bacteria, and a decomposition phase where injection of the nutrition salts, oxygen and substrates is terminated and the organic chlorine compounds are decomposed by the decomposing enzyme induced in the metabolizing bacteria, and the multiplication phase and the decomposition phase are carried out repeatedly and alternately by switching every few months, to cleanse the stratum polluted with organic chlorine compounds. Alternatively, use can be made of an applicant's previously proposed method wherein the multiplication phase is the same as above, but the decomposition phase involves supplying the substrate to the stratum during which the concentration of the dissolved substrate in ground water is regulated, without stopping the supply of oxygen and nutrition salts, to be lower than the concentration of the dissolved substrate in the multiplication step, and the multiplication phase and the decomposition phase are carried out repeatedly and alternately. Then, the number of methane metabolizing bacteria in the ground water is counted with time, and when the number of the bacteria reaches a predetermined number, for

example, a number of bacteria in the range of  $10^4$  to  $10^6$  MPN/ml, the decomposition phase is switched to the multiplication phase.

In the prior-art method, the number of methane-metabolizing bacteria in ground water is counted by an MPN method or a plate method. Now, the procedure for calculating the number of methane-metabolizing bacteria in ground water by the MPN method is specifically described. First, 1 ml ground water diluted by a predetermined procedure and 4 ml NMS (nitrate mineral salts) are introduced into a test tube and sealed with an aluminum cap, and the test tube is placed in a reduced-pressure desiccator. Then, 30 % by volume of the air in the reduced-pressure desiccator is replaced by methane ( $\text{CH}_4$ ), followed by stationary culture for 28 days at a temperature of  $25^\circ\text{C}$ . Then, the number of methane-metabolizing bacteria is determined on the basis of the turbidity in the test tube by reference to a standard table.

[Problem to Be Solved by the Invention]

The conventional method of switching from the multiplication phase to the decomposition phase by the above-described method of calculating the number of methane-metabolizing bacteria suffers from the following problems. A first problem is that at least one month is required until the number of methane-metabolizing bacteria can be calculated by the MPN method after collection of ground water

from the polluted stratum. This means that at the time when the number of the methane-metabolizing bacteria could be confirmed to reach a predetermined number, the multiplication phase had been carried out for an unnecessarily long period of at least one month so that the polluted stratum could not be efficiently cleansed.

A second problem is that the organic chlorine compound-decomposing activity of the decomposing enzyme induced in the methane-metabolizing bacteria cannot be detected by the method of detecting the number of the methane-metabolizing bacteria, and thus it is difficult to accurately recognize the time of switching from the multiplication phase to the decomposition phase and vice versa. That is, the decomposing enzyme of the methane-metabolizing bacteria includes 2 kinds of enzyme i.e. SMMO decomposing organic chlorine compounds such as TCE etc. and PMMO not contributing to decomposition of the organic chlorine compounds, as described above. In the prior-art method by the MPN method, however, the number of methane-metabolizing bacteria only is calculated, and the concentration of SMMO as the subject, or the activity of SMMO in decomposing organic chlorine compounds, cannot be detected, so it is difficult to accurately recognize the time of switching from the multiplication phase to the decomposition phase and vice versa. These problems also arise in the method of calculating the

number of methane-metabolizing bacteria by the plate method.

In the foregoing, the method of cleansing a stratum and ground water polluted with organic chlorine compounds by in situ bioremediation has been described, but the problems described above also apply to the reactor method. In the reactor method, oxygen, nutrition salts and a substrate necessary for multiplication of methane-metabolizing bacteria are supplied to a reactor having a packed layer charged with a packing material or to a bacteria floating-type reactor fundamentally not requiring the packed layer, whereby the methane-metabolizing bacteria are multiplied in the reactor thereby inducing SMMO, while ground water raised from the polluted stratum is sent to the reactor, and organic chlorine compounds in the ground water are decomposed by the induced SMMO in the reactor.

As described above, it is difficult in the conventional cleansing methods to accurately detect the activity of the decomposing enzyme to decompose organic chlorine compounds, thus making it difficult to correctly recognize the time for switching from the multiplication phase to the decomposition phase and vice versa. Hence, the conventional methods of cleansing a stratum and ground water polluted with organic chlorine compounds by the bioremediation techniques are poor in cleansing efficiency and not economical for practical use. Accordingly, the object of the invention is to provide a method

of efficiently cleansing a stratum and ground water polluted with organic chlorine compounds by the bioremediation techniques.

[Means to Solve the Problem]

To solve the problems in the prior art, the inventor studied a method of directly detecting the organic chlorine compound-decomposing activity of the decomposing enzyme effective for decomposition of organic chlorine compounds in place of the method of calculating the number of metabolizing bacteria. As a result, the inventor found that it is time-consuming to directly measure the organic chlorine compound-decomposing activity of the decomposing enzyme by gas chromatography or the like, gas chromatographic units are expensive, and the measured value varies easily to make it difficult to detect a trace of the activity, so that gas chromatography is technically not advantageous as a measurement method used in situ where the bioremediation method is adopted. Accordingly, the inventor studied a method of indirectly measuring the activity of decomposing organic chlorine compounds, and conducted the following experiments.

On the basis of the foregoing findings and for achieving the object described above, the method of cleansing a stratum and ground water polluted with organic chlorine compounds according to the invention is a method of cleansing a polluted



stratum and ground water polluted with organic chlorine compounds by lowering the concentration of the organic chlorine compounds in the stratum and ground water by use of metabolizing bacteria selected from the group consisting of methane-metabolizing bacteria, toluene-metabolizing bacteria, phenol-metabolizing bacteria and ammonia-metabolizing bacteria for decomposing the organic chlorine compounds by a decomposing enzyme induced in the bacteria upon oxidation of methane, toluene, phenol or ammonia as the substrate, said method comprising a measurement step of mixing a reagent with ground water collected from the polluted stratum and then oxidizing the reagent by the decomposing enzyme present in the ground water to measure the activity of the decomposing enzyme, wherein the amounts of the substrate, oxygen and nutrition salts supplied to the metabolizing bacteria are regulated on the basis of the activity of the decomposing enzyme determined in the measurement step.

The reagent used in the method of the invention is a substrate subjected to oxidation reaction by the decomposing enzyme, and in the case of SMMO from the methane-metabolizing bacteria, the reagent includes e.g. unsaturated hydrocarbons such as naphthalene, propene etc. The correlation between the oxidizing activity and organic chlorine compound-decomposing activity of the decomposing enzyme is previously determined as described above by reference to SMMO. The method of

measuring the oxidizing activity of the decomposing enzyme is not particularly limited, and for example, colorimetry, spectrometry, gas chromatography etc. can be used.

A preferable embodiment of the invention (first embodiment) comprises the step of multiplying the metabolizing bacteria in a polluted stratum by supplying oxygen, nutrition salts and the substrate necessary for multiplication of the metabolizing bacteria to the polluted stratum thereby inducing the decomposing enzyme, and after the step of multiplying the metabolizing bacteria, the step of decomposing the organic chlorine compounds by stopping the supply of the substrate, oxygen and nutrition salts to the polluted stratum, or by supplying the substrate, without stopping the supply of oxygen and nutrition salts, to the polluted stratum while regulating the concentration of the dissolved substrate in the ground water to be lower than the concentration of the dissolved substrate in the step of multiplying the metabolizing bacteria, in order to decompose the organic chlorine compounds by the decomposing enzyme induced in the metabolizing bacteria, wherein the switching of from the step of multiplying the metabolizing bacteria to the step of decomposing the organic chlorine compounds is conducted on the basis of the activity of the decomposing enzyme determined in the measurement step. The method of cleansing a stratum and ground water polluted with organic chlorine compounds by the in situ bioremediation

techniques can thereby be efficiently effected.

Another preferable embodiment of the invention (second embodiment) comprises the step of multiplying the metabolizing bacteria by supplying oxygen, nutrition salts and the substrate necessary for the metabolizing bacteria to a reactor to multiply the metabolizing bacteria in a packed layer therein thereby inducing the decomposing enzyme, and after the step of multiplying the metabolizing bacteria, the step of decomposing the organic chlorine compounds by sending ground water drawn from the polluted stratum to the reactor and simultaneously stopping the supply of the substrate, oxygen and nutrition salts to the reactor, or supplying the substrate, without stopping the supply of oxygen and nutrition salts, to the reactor while regulating the concentration of the dissolved substrate in the reactor to be lower than the concentration of the dissolved substrate in the step of multiplying the metabolizing bacteria, in order to decompose the organic chlorine compounds in ground water sent to the reactor by the decomposing enzyme induced in the metabolizing bacteria, wherein the switching of from the step of multiplying the metabolizing bacteria to the step of decomposing the organic chlorine compounds is conducted on the basis of the activity of the decomposing enzyme determined in the measurement step. The method of cleansing a stratum and ground water polluted with organic chlorine compounds by the reactor techniques can

thereby be efficiently effected.

A further preferable embodiment of the invention is characterized in that the methane-metabolizing bacteria are selected as the metabolizing bacteria, and in the measurement step, ground water collected from the polluted stratum is mixed with a reagent followed by oxidizing the reagent by the oxidizing activity of a soluble methane monooxidase in the ground water to measure the oxidizing activity of the soluble methane monooxidase.

According to the method of the invention, the activity of the decomposing enzyme to decompose organic chlorine compounds can be detected accurately and rapidly. Further, the switching from the multiplying the metabolizing bacteria to the step of decomposing the organic chlorine compounds and vice versa can be recognized accurately and rapidly. Further, the supply of the substrate, the enzyme and nutrition salts can be theoretically optimized and controlled in the process in order to reduce the cleansing costs and to shorten the cleansing time.

Fig. 3 shows the results of treatment of TCE in the polluted stratum by bioremediation in the conventional method and the method of the invention. From these results, the followings can be understood.

(1) In the conventional method, the multiplication phase is

switched to the decomposition phase in view of the degree of multiplication of the methane-metabolizing bacteria, and thus the timing of switching from the multiplication phase to the decomposition phase was delayed for one month. Further, there is no means of accurately and immediately knowing the ability to decompose TCE in the decomposition phase, and thus the time of switching from the decomposition phase to the multiplication phase is also delayed for one month. On the other hand, in the method of the invention, the ability to decompose TCE in the polluted stratum can be immediately grasped by measuring the activity of SMMO to decompose TCE, and thus the timing of switching between the multiplication phase and the decomposition phase can be earlier than in the conventional method.

(2) By grasping the TCE-decomposing activity of SMMO in the polluted layer during the decomposition phase, the injection of methane can be initiated again, or the amount of the injection can be regulated in view of the level of SMMO activity, thus improving the efficiency of decomposition of TCE during the decomposition phase.

[Brief Description of the Drawings]

[Fig. 1] A conceptual drawing showing the constitution of stratum-cleansing facilities for carrying out the method of the invention in Example 1.

(19)日本国特許庁 (J P)

(12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-234490

(43)公開日 平成9年 (1997) 9月9日

(51)Int.Cl. <sup>°</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 2 F 3/34			C 0 2 F 3/34	Z
B 0 9 C 1/10	Z A B		B 0 9 B 3/00 Z A B	E

審査請求 未請求 請求項の数4 F D (全 9 頁)

(21)出願番号 特願平8-73215

(22)出願日 平成8年 (1996) 3月4日

(71)出願人 000004400

オルガノ株式会社

東京都文京区本郷5丁目5番16号

(72)発明者 江口 正浩

埼玉県戸田市川岸1丁目4番9号 オルガノ

株式会社総合研究所内

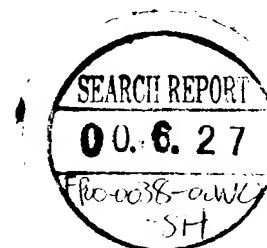
(74)代理人 弁理士 大澤 斌 (外2名)

(54)【発明の名称】 有機塩素化合物で汚染された地層および地下水の浄化方法

(57)【要約】

【課題】 バイオレメディエーション技術により有機塩素化合物で汚染された地層および地下水を効率良く浄化する方法を提供することである。

【解決手段】 本発明方法は、資化菌、例えばメタンを基質とし、基質の酸化に伴って誘導した分解酵素により有機塩素化合物を分解するメタン資化菌を利用して、有機塩素化合物による汚染地層及び地下水の有機塩素化合物濃度を低下させ、汚染地層及び地下水を浄化する方法である。本方法は、汚染地層から採取した地下水と試薬とを混合して地下水中の分解酵素により試薬を酸化させて、分解酵素の活性を測定する測定工程を備え、測定工程で求めた前記活性に基づいて資化菌の基質、酸素及び栄養塩の供給を制御する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 それぞれ、メタン、トルエン、フェノール及びアンモニアを基質とし、基質の酸化に伴って誘導した分解酵素により有機塩素化合物を分解するメタン資化菌、トルエン資化菌、フェノール資化菌及びアンモニア資化菌からなる群から選定したいずれかの資化菌を利用して、有機塩素化合物による汚染地層及び汚染地下水の有機塩素化合物濃度を低下させ、汚染地層及び汚染地下水を浄化する方法であって、

汚染地層から採取した地下水と試薬とを混合して地下水中の分解酵素により試薬を酸化させ、分解酵素の活性を測定する測定工程を備え、

測定工程で求めた分解酵素の活性に基づいて資化菌の基質、酸素及び栄養塩の供給量を制御することを特徴とする有機塩素化合物で汚染された地層および地下水の浄化方法。

【請求項2】 資化菌の増殖に必要な酸素、栄養塩及び基質を汚染地層に供給して汚染地層中で資化菌を増殖させ、それにより分解酵素を誘導する資化菌増殖工程と、資化菌増殖工程に続いて、汚染地層への基質、酸素及び栄養塩の供給を停止するか、又は酸素及び栄養塩の供給を停止することなく、地下水の溶存基質濃度が資化菌増殖工程の溶存基質濃度より低くなるように調製して、汚染地層に基質を供給して、資化菌により誘導された分解酵素により有機塩素化合物を分解する有機塩素化合物分解工程とを備え、

資化菌増殖工程と有機塩素化合物分解工程との切替えを測定工程で求めた分解酵素の活性に基づいて行うことを特徴とする請求項1に記載の有機塩素化合物で汚染された地層および地下水の浄化方法。

【請求項3】 資化菌の増殖に必要な酸素、栄養塩及び基質をリアクタに供給して充填層中で資化菌を増殖させ、それにより分解酵素を誘導する資化菌増殖工程と、資化菌増殖工程に続いて、汚染地層から汲み上げた地下水をリアクタに送入する一方、リアクタへの基質、酸素及び栄養塩の供給を停止するか、又は酸素及び栄養塩の供給を停止することなく、リアクタ内の溶存基質濃度が資化菌増殖工程の溶存基質濃度より低くなるように調製して、リアクタ内に基質を供給して、リアクタに送水される地下水中の有機塩素化合物を資化菌より誘導された分解酵素によって分解する有機塩素化合物分解工程とを備え、

資化菌増殖工程と有機塩素化合物分解工程との切替えを測定工程で求めた分解酵素の活性に基づいて行うことを特徴とする請求項1に記載の有機塩素化合物で汚染された地層および地下水の浄化方法。

【請求項4】 資化菌としてメタン資化菌を選定し、測定工程では、汚染地層から採取した地下水と試薬とを混合し、地下水中の可溶性メタンモノオキシゲナーゼの酸化活性によって試薬を酸化させ、可溶性メタンモノオキ

シゲナーゼの酸化活性を測定することを特徴とする請求項1から3のうちのいずれか1項に記載の有機塩素化合物で汚染された地層および地下水の浄化方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、トリクロロエチレン等の有機塩素化合物で汚染された地層およびこの地層中の地下水を微生物学的に浄化する方法に関し、更に詳細には、有機塩素化合物で汚染された地層及びその地層中の地下水を原位置バイオレメディエーション法又はバイオリアクタ法により速やかにかつ経済的に浄化する方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】トリクロロエチレン( $C_2HCl_3$ 、以下、TCEと略記する)や、テトラクロロエチレン( $C_2Cl_4$ )などの有機塩素化合物は、油脂等に対する溶解性が高いので、一般溶剤、脱脂用洗浄剤等として各種の工場及びクリーニング店等で広く使用されている。そのため、長年の間に、これらの有機塩素化合物のかんりの量が、使用中に誤って外部に流出したり、或いは廃棄されたりして、地層及び地下水を汚染している。ところで、これらの有機塩素化合物は発ガン性物質であるという恐れがあるため、汚染された地層及びその地層中の地下水の浄化が、近年、大きな社会的要望となっている。そこで、汚染地層及びその地層中の地下水を浄化するための対策が、従来から、種々の方法により施されて来た。

【0003】これまでに施されて来た浄化方法は、主として、有機塩素化合物を一定の領域に封じ込める封じ込め法、汚染土壌を掘削して非汚染土壌で埋め戻す取り替え法、地下水を揚水し、次いで曝気して有機塩素化合物を大気中に放散する曝気法、真空抽気と活性炭吸着などの組み合わせによるポンプ&トリート法等の物理化学的方法である。しかし、これらの物理化学的方法は、高濃度の有機塩素化合物汚染には有効であるものの、設備費及び運転費が高むために広範囲の低濃度汚染の浄化には経済性に乏しく、また有機塩素化合物を分解し、無害化する技術ではないために、汚染地層から回収した有機塩素化合物による二次汚染の問題があった。

【0004】そこで、微生物を利用して有機塩素化合物を分解する処理方法、特に汚染サイトで実施する原位置バイオレメディエーション技術或いは処理用リアクタを設けて、そこで微生物学的に処理するリアクタ式バイオレメディエーション技術の開発が進んでいる。原位置バイオレメディエーション(bioremediation)による地層および地下水の浄化方法は、有機塩素化合物等の汚染物質に対する分解能を有する微生物を汚染サイトの地層中で増殖、活性化して、微生物の作用により汚染物質を原位置、即ち地層中で分解して無害な物質に転化することにより、地層および地下水を浄化する方法を言う。リアクタ式バイオレメディエーションによる地層および地下

水の浄化方法は、汚染物質の微生物学的な分解を汚染地層中で行う代わりに、処理用リアクタを別途設け、そこで浄化を行う方法であって、汚染物質に対する分解能を有する微生物をリアクタ内で増殖、活性化し、汚染地層から汲み上げた地下水をリアクタに送入して、リアクタ内で微生物の作用により地下水中の汚染地層を分解して無害な物質に転化することにより、地層および地下水を浄化する方法を言う。

【0005】有機塩素化合物による汚染を微生物学的に浄化する場合、有機塩素化合物を直接資化できる菌は、地層中に存在していないので、メタン、トルエン、フェノール、アンモニア等をそれぞれ資化する菌（以下、それぞれメタン資化菌、トルエン資化菌、フェノール資化菌、アンモニア資化菌と言う）の共酸化を利用した処理方法が検討されている。この方法は、メタン資化菌等の資化菌の増殖に必要な栄養塩及び酸素に加えて、メタン資化菌等の資化菌のそれぞれの基質として、環境的に比較的害の少ないメタン、トルエン、フェノール、アンモニアなどを処理リアクター又は汚染サイトに注入して資化菌を増殖し、有機塩素化合物を基質として分解する分解酵素を資化菌により誘導する。そして、誘導された分解酵素により有機塩素化合物を分解し、無害な物質に転化する方法である。

【0006】ところで、上記のような資化菌の共酸化を利用した原位置バイオレメディエーション方法を実施する際、メタンなどの基質が汚染サイトに高濃度で有機塩素化合物と共存した場合、基質の競争阻害が生じ、汚染物質の分解速度が極端に低下する。これは、リアクタ式バイオレメディエーション方法による場合も同様である。

【0007】以下に、メタン資化菌を例にして原位置バイオレメディエーション方法による場合を更に説明する。メタン資化菌は、メタンの酸化の過程で、TCE等の有機塩素化合物を分解する可溶性メタンモノオキシゲナーゼ（以下、sMMOと略記する）と、有機塩素化合物の分解に寄与しない膜結合性メタンモノオキシゲナーゼ（以下、pMMOと略記する）との2種類のメタンモノオキシゲナーゼを誘導することが知られている。メタン資化菌によるメタンの酸化反応は、図6に示す4段階の酵素反応で進行し、メタン資化菌より誘導されたsMMOは、メタンを酸化してメタノールを生成する第1段階の反応を触媒する。図6に示すメタン酸化反応の第1段階において、基質がメタンからTCEに代わると、図7に示すような共酸化によるTCE分解反応が起きる。このTCE分解反応は、図6のメタンの酸化反応の第2段階以降では起こらない。

【0008】sMMOが触媒するTCE分解反応では、本来の基質であるメタンと共酸化反応の基質であるTCEとは互いに競争的な阻害剤として作用するので、TCEの分解反応は、高濃度のメタンにより競争的に阻害さ

れると言う問題がある。即ち、メタンが高濃度で共存した場合には、TCEはほとんど分解されず、逆に、メタンが不足する場合には、メタン資化菌が増殖せず、またsMMOも誘導されることもない。また、sMMOによるTCEの分解反応が進行すると、TCEの分解反応の反応中間体であるトリクロロエチレンエポキシドが蓄積し、それによりsMMOの活性が失活すると言う問題がある。

【0009】そこで、従来、共酸化を利用した有機塩素化合物汚染地層の浄化方法を実施する際、栄養塩、酸素及びメタン等の基質を注入して、専ら資化菌を増殖させる増殖フェーズと、次いで、栄養塩、酸素及び基質の注入を停止し、資化菌により誘導された分解酵素により専ら有機塩素化合物を分解する分解フェーズとの2段階に分け、増殖フェーズと分解フェーズとを数カ月ごとに交互に切り換えて各フェーズを繰り返す、有機塩素化合物汚染地層の浄化を行って来た。また、本出願人が先に提案した方法であるが、前記増殖フェーズは同じであるが、分解フェーズとして、酸素及び栄養塩の供給を停止することなく、地下水の溶存基質濃度が資化菌増殖工程の溶存基質濃度より低くなるように調製して、地層に基質を供給する分解フェーズとを交互に繰り返す方法も採用できる。そして、経時的に地下水中のメタン資化菌の菌数を計数し、その菌数が所定菌数、例えば $10^4 \sim 10^6$  MPN/mlの範囲の菌数に到達した時点で、増殖フェーズから分解フェーズに切り換え、メタン資化菌の菌数が所定菌数に減少して時点で分解フェーズから増殖フェーズに切り換えていた。

【0010】ところで、従来は、地下水中のメタン資化菌の菌数の計数は、MPN法又はプレート法により行ってきた。ここで、MPN法により地下水中のメタン資化菌の菌数を算出する手順を具体的に説明する。先ず、所定の手順で希釈された1mlの希釈地下水を4mlのNMS (Nitrate Mineral Salts) 培地と共に試験管に入れて、アルミキャップで封止し、その試験管を減圧デシケータに収める。続いて、減圧デシケータ中の30容積%の空気をメタン( $\text{CH}_4$ )で置換した後、 $25^\circ\text{C}$ に維持し、28日間静置培養を行う。次いで、試験管中の白濁程度に基づいて基準表と対照してメタン資化菌の菌数を求めている。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】しかし、上述したメタン資化菌の菌数算出法により増殖フェーズから分解フェーズに切り換える従来の方法には、次のような問題があった。第1には、汚染地層から地下水を採取し、MPN法によりメタン資化菌の菌数を算出できる迄には、少なくとも1か月の日数を要するということである。これでは、例えばメタン資化菌の菌数が所定菌数に達していることが確認できた時点で、既に増殖フェーズを必要以上に長く、少なくとも一カ月は必要以上に長く実施したこと



になり、汚染地層の浄化を効率的にできないという問題があった。

【0012】第2には、メタン資化菌の菌数を検出する方法では、メタン資化菌により誘導された分解酵素の有機塩素化合物分解活性を検出できないので、増殖フェーズから分解フェーズに、及び、その逆に切り換える時期を的確に認識することが難しいということである。更に説明すると、上述のように、メタン資化菌の分解酵素には、TCE等の有機塩素化合物を分解するsMMOと、有機塩素化合物の分解に寄与しないpMMOの2種類がある。それにもかかわらず、MPN法による従来の方法では、メタン資化菌の菌数のみを算出し、肝心のsMMOの濃度、或いはsMMOの有機塩素化合物分解活性を検出することができないので、増殖フェーズから分解フェーズに、及び、その逆に切り換える時期を的確に認識することが難しい。これらの問題は、プレート法によるメタン資化菌の菌数を算出する方法についても同様である。

【0013】以上の説明では、原位置バイオレメディエーション法による有機塩素化合物汚染の地層および地下水の浄化方法を例にして説明したが、リアクタ法の場合であっても、上述の問題は同じである。リアクタ法では、充填材を充填した充填層を有するリアクタ、あるいは充填層を基本的には必要としない菌体浮遊式のリアクタに、メタン資化菌の増殖に必要な酸素、栄養塩及び基質を供給してリアクタ内でメタン資化菌を増殖させ、それによりsMMOを誘導する一方、汚染地層から汲み上げた地下水をリアクタに送入し、リアクタ内で送水された地下水中の有機塩素化合物を誘導されたsMMOによって分解している。

【0014】以上のように、従来の浄化方法では、分解酵素の有機塩素化合物分解活性を正確に検出することが難しく、また、増殖フェーズから分解フェーズに、及び、その逆に切り換える時期を的確に素早く認識することが難しいために、バイオレメディエーション技術による有機塩素化合物汚染の地層および地下水の浄化方法は、実用化するには浄化効率が低く、経済性が欠けていた。よって、本発明の目的は、バイオレメディエーション技術により有機塩素化合物で汚染された地層および地下水を効率良く浄化する方法を提供することである。

【0015】

【課題を解決するための手段】本発明者は、従来の方法の問題を解決するために、資化菌の菌数の算出に代えて、有機塩素化合物の分解に有効な分解酵素の有機塩素化合物分解活性を直接的に検出する方法を研究した。その結果、分解酵素の有機塩素化合物分解活性をガスクロマトグラフィ等にて直接測定するのは、測定に時間を要し、かつ、ガスクロマトグラフィー自体が高価であり、しかも測定値がバラツキ易いため微量の前記活性を検出することが難しく、バイオレメディエーション法を実施

している現場で採用する測定法としては技術的に有利でないことを見出した。そこで、本発明者は、分解酵素の有機塩素化合物分解活性を間接的に測定する方法を研究し、次の実験を行った。

【0016】実験例

汚染地層から地下水を採取して、10容量%のNMS培地と共にバイアルビンに投入した後、30%濃度になるようにメタンガスをバイアルビンに封入した。そして、波長600nmでのOD (Optical Density 光学濃度、以下OD600nmと言う) 及びsMMO活性及びTCE分解活性を以下に説明する測定方法によりそれぞれ経目的に測定した。

【0017】sMMO活性の測定方法は、以下の通りである。汚染地層から地下水を採取し、OD600nm=0.2になるように希釈して試料地下水を調製する(OD600nm<0.2の場合には希釈は不要である)。次に、1mlの試料地下水に飽和ナフタレン溶液1mlを添加し、30℃に維持しつつ3時間振盪し、試料地下水中のsMMOによりナフタレンを酸化して1-又は2-ナフトールに転化させる。続いて、0.2%のTetrazotized 0-dianisidine溶液100μlを振盪した試料地下水に添加する。これにより、1-又は2-ナフトールが生成しておれば、1-又は2-ナフトールとTetrazotized 0-dianisidineとが反応して、Naphthol Diazo Dyeを生成し、試料地下水は赤紫色を呈する。次いで、波長525nmの光による吸光度を測定し、モル吸光係数(1cmの厚さの吸収層に対する溶液のモル濃度比)に基づいてsMMOの酸化活性値を求める。モル吸光係数は、Naphthol Diazo Dyeの場合、38,000M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>である。

【0018】また、TCE分解活性の測定方法は、以下の通りである。汚染地層から採取した1mlの地下水をバイアルビンに入れ、更に、地下水にギ酸ナトリウムを20mMになるように添加して、試料地下水を調製する。バイアルビンにゴム栓とアルミシールを施して封止し、更に、地下水に1,100mg/l濃度のTCE水溶液を5μl添加する。続いて、30℃に維持しつつ200rpmで1時間から3時間振盪させ、地下水中のsMMOとTCEとを反応させた後、地下水中のTCE濃度をガスクロマトグラフィによりヘッドスペース法により測定する。TCEを添加した時点の地下水のTCE濃度と測定したTCE濃度との差をTCE分解活性とする。

【0019】得たTCE分解活性とsMMO活性との関係は、図5に示すような関係を有す。これは、測定し易いsMMOの酸化活性を測定し、それによりsMMOのTCE分解活性を一義的に求めることができることを示している。

【0020】以上の知見に基づき、上記目的を達成するために、本発明に係る有機塩素化合物による汚染地層及び地下水の浄化方法は、それぞれ、メタン、トルエン、フェノール及びアンモニアを基質とし、基質の酸化に伴

って誘導した分解酵素により有機塩素化合物を分解するメタン資化菌、トルエン資化菌、フェノール資化菌及びアンモニア資化菌からなる群から選定したいすれかの資化菌を利用して、有機塩素化合物による汚染地層及び汚染地下水の有機塩素化合物濃度を低下させ、汚染地層及び汚染地下水を浄化する方法であって、汚染地層から採取した地下水と試薬とを混合して地下水中の分解酵素により試薬を酸化させ、分解酵素の活性を測定する測定工程を備え、測定工程で求めた分解酵素の活性に基づいて資化菌の基質、酸素及び栄養塩の供給量を制御することを特徴としている。

【0021】本発明方法で使用する試薬は、分解酵素の酸化反応の対象となる基質であって、例えばメタン資化菌のsMMOの場合には、ナフタレン、プロペン等の不飽和炭化水素である。また、分解酵素の酸化活性と有機塩素化合物分解活性との相関関係は、sMMOの場合を例にして上述したように、予め求めておく。分解酵素の酸化活性を測定する方法は、制約はなく、例えば比色法、吸光法、ガスクロマトグラフィ法等を使用できる。

【0022】本発明の好適な実施態様（第1実施態様）は、資化菌の増殖に必要な酸素、栄養塩及び基質を汚染地層に供給して汚染地層中で資化菌を増殖させ、それにより分解酵素を誘導する資化菌増殖工程と、資化菌増殖工程に続いて、汚染地層への基質、酸素及び栄養塩の供給を停止するか、又は酸素及び栄養塩の供給を停止することなく、地下水の溶存基質濃度が資化菌増殖工程の溶存基質濃度より低くなるように調製して、汚染地層に基質を供給して、資化菌により誘導された分解酵素により有機塩素化合物を分解する有機塩素化合物分解工程とを備え、資化菌増殖工程と有機塩素化合物分解工程との切替えを測定工程で求めた分解酵素の活性に基づいて行うことを特徴としている。これにより、原位置バイオレメディエーション法により有機塩素化合物で汚染された地層及び地下水の浄化方法を効率的に実施できる。

【0023】また、本発明の別の好適な実施態様（第2実施態様）は、資化菌の増殖に必要な酸素、栄養塩及び基質をリアクタに供給して充填層中で資化菌を増殖させ、それにより分解酵素を誘導する資化菌増殖工程と、資化菌増殖工程に続いて、汚染地層から汲み上げた地下水をリアクタに送入する一方、リアクタへの基質、酸素及び栄養塩の供給を停止するか、又は酸素及び栄養塩の供給を停止することなく、リアクタ内の溶存基質濃度が資化菌増殖工程の溶存基質濃度より低くなるように調製して、リアクタ内に基質を供給して、リアクタに送水される地下水中の有機塩素化合物を資化菌より誘導された分解酵素によって分解する有機塩素化合物分解工程とを備え、資化菌増殖工程と有機塩素化合物分解工程との切替えを測定工程で求めた分解酵素の活性に基づいて行うことを特徴としている。これにより、有機塩素化合物で汚染された地層及び地下水をリアクタ法により浄化する

方法を効率的に実施できる。

【0024】本発明の更に好適な実施態様は、資化菌としてメタン資化菌を選定し、測定工程では、汚染地層から採取した地下水と試薬とを混合し、地下水中の可溶性メタンモノオキシゲナーゼの酸化活性によって試薬を酸化させ、可溶性メタンモノオキシゲナーゼの酸化活性を測定することを特徴としている。

【0025】本発明方法により、分解酵素の有機塩素化合物分解活性を正確にしかも速やかに検出することができ、また、資化菌増殖工程から有機塩素化合物分解工程への、及び、その逆への切り換えを的確に素早く認識することができる。また、基質、酸素及び栄養塩の供給を最適化して理論的なプロセス制御を行うことができるので、浄化コストを節減することができ、かつ浄化期間を短縮することができる。

【0026】

【発明の実施の形態】以下に、添付図面を参照し、本発明方法の実施の形態を具体的に説明する。

#### 実施例1

図1は、本発明方法の第1実施態様を適用する原位置バイオレメディエーション設備（以下、簡単に地層浄化設備と言う）の一例の構成を示す概念図である。地層浄化設備10は、汚染地層に存在するメタン資化菌を利用して、本発明方法の第1実施態様により有機塩素化合物汚染地層を浄化する設備であって、汚染地層の上に設置されている。地層浄化設備10は、図1に示すように、酸素、メタン及び必要な栄養塩を水に溶解する溶解・注入装置12と、酸素、メタン及び必要な栄養塩を溶解した水を汚染地層に注水する注入井14と、地下水中の酸素濃度、メタン濃度、栄養塩濃度、メタン資化菌の菌数、有機塩素化合物濃度等を測定するために試料地下水を汲み上げる観測井16と、汚染地層中の地下水を汲み上げる揚水井18と、揚水井18で揚水した地下水を曝気する曝気塔20とを備えている。

【0027】曝気塔20で曝気された地下水は、ポンプ22により注入井14に送られ、その途中で溶解・注入装置12より供給された酸素、メタン及び必要な栄養塩を溶解し、注入井14を介して再び地層中に返される。曝気塔20は、ラシヒリング等の通常の充填材で形成された充填層と、ブロア24から送入される空気を噴出するように充填層の下に設けたノズルとを備え、揚水した地下水を塔上部から流下させつつ、充填層の下ノズルから空気を噴出させて、地下水を充填層中で曝気する。尚、曝気塔20は、本発明方法の実施には必ずしも必要ではない。更に、本地層浄化設備10は、観測井16から揚水した試料地下水のsMMOのTCE分解活性を検出する検出装置26と、検出装置26の検出信号に基づいて注入井14に注入する地下水に供給する酸素、メタン及び栄養塩の供給量を調節する調節弁28とを備えている。

【0028】以下に、本地層浄化設備10を使用して、本発明方法を実施する例を説明する。資化菌増殖工程（以下、簡単に増殖工程と言う）では、メタン資化菌の増殖に必要な酸素、栄養塩及びメタンを溶解・注入装置12から注入井14に返す地下水に供給し、次いで注入井14から汚染地層に戻すことにより、メタン資化菌の増殖に必要な酸素、栄養塩及びメタンを汚染地層に連続的に供給する。増殖工程の実施中、観測井16から定期的に試料地下水を採取し、採取した試料地下水中のsMMOのTCE分解活性を検出装置26により検出する。検出するに際しては、先ず、以下に説明する方法でsMMOの酸化活性を求める。

【0029】汚染地層から観測井16を介して地下水を採取し、OD600nm=0.2になるように希釈して試料地下水を調製する（OD600nm<0.2の場合には希釈は不要である）。次に、1mlの試料地下水に飽和ナフタレン溶液1mlを添加し、30℃に維持しつつ3時間振盪し、試料地下水中のsMMOによりナフタレンを酸化して1-又は2-ナフトールに転化させる。続いて、0.2%のTetrazotized 0-dianisidine溶液100μlを振盪した試料地下水に添加する。これにより、1-又は2-ナフトールが生成しておれば、1-又は2-ナフトールとTetrazotized 0-dianisidineとが反応して、Naphthol Diazo Dyeを生成し、試料地下水は赤紫色を呈する。次いで、波長525nmの光による吸光度を測定し、モル吸光係数（1cmの厚さの吸収層に対する溶液のモル濃度比）に基づいてsMMOの酸化活性値を求める。モル吸光係数は、Naphthol Diazo Dyeの場合、38,000M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>である。

【0030】次いで、実験により予め設定した図5に示すようなsMMOの酸化活性とTCE分解活性との相関関係からsMMOのTCE分解活性を求める。検出したTCE分解活性に基づき、予め設定されているsMMOのTCE分解活性と酸素、メタン及び栄養塩の注入量との相関関係に従って検出装置26より信号を出力し、それにより、調節弁28を調節して、酸素、メタン及び栄養塩の注入量を調整する。例えば、地層の地下水中のsMMOのTCE分解活性が、所定の数値に到達した時点で、増殖工程を終了し、次の有機塩素化合物分解工程（以下、簡単に分解工程と言う）に移行する。また、分解工程でも増殖工程と同様にsMMOのTCE分解活性を測定して、汚染地層中のTCE分解能を把握し、分解工程から増殖工程に移行するようにすることもできる。

【0031】図2は、本実施例の観測井16から採取した地下水中のメタン資化菌数、sMMO酸化活性及びTCE分解活性のそれぞれ変化を示したものである。この結果から、汚染地層中のメタン資化菌の増殖状況からだけでは、sMMOのTCE分解活性の状況を把握できないことが明白であると共に汚染地層中のsMMOの酸化活性とTCE分解活性との相関も明白である。

【0032】図3は、従来方法と本発明方法によるバイオレメディエーションによる汚染地層のTCEの処理結果を示している。これにより、以下のことが判る。

(1) 従来方法では、メタン資化菌の増殖度合いを見て、増殖工程から分解工程に移行していたために、増殖工程から分解工程の切り替えのタイミングが1か月ずれていた。また、分解工程におけるTCE分解能の状況を正確にすぐ知る手段もなかったため、分解工程から増殖工程へのフェーズ切り替えの時期も1か月遅れていた。これに対し、本発明方法ではsMMOのTCE分解活性を測定することにより、汚染地層でのTCE分解能をすぐに把握する事ができるため、増殖工程と分解工程との間の切り替えのタイミングが従来方法に比べ早く切り替えることができる。

(2) また、分解工程における汚染地層のsMMOのTCE分解活性を把握することにより、再びメタンの注入を開始したり、その注入量をsMMO活性の値をみながら制御することができるので、分解工程でのTCE分解効率が向上する。

#### 20 【0033】実施例2

図4は、本発明方法の第2実施態様を適用した充填層を有するリアクタ法によるバイオレメディエーション装置（以下、簡単に地層浄化設備と言う）の一例の構成を示す概念図である。地層浄化設備30は、リアクタ内の充填層でメタン資化菌を繁殖させ、これにより有機塩素化合物汚染地層を浄化する設備であって、リアクタは通常汚染地層の上に設置されている。地層浄化設備30は、図1に示すように、酸素、メタン及び必要な栄養塩を水に溶解する溶解・注入装置32と、浄化された地下水を汚染地層に戻す注入井34と、地下水中の酸素濃度、メタン濃度、栄養塩濃度、メタン資化菌の菌数、有機塩素化合物等を測定するための観測井36と、汚染地層中の地下水を汲み上げる揚水井38と、揚水井38で揚水した地下水を浄化するリアクタ40とを備えている。

【0034】リアクタ40には常用の充填材を充填した充填層が設けられ、充填層内で増殖工程、次いで分解工程が実施される。リアクタ40の充填層には必要な酸素、メタン及び必要な栄養塩が溶解・注入装置32から塔上部に供給され、充填層内でメタン資化菌が繁殖すると共に繁殖したメタン資化菌によりsMMOが誘導される。一方、揚水した地下水が塔上部から流下し、地下水中のTCEが充填層内で誘導されたsMMOにより分解される。浄化された地下水は、ポンプ42により注入井34に送られ、注入井34を介して再び地層中に返される。更に、本地層浄化設備30は、観測井36から揚水した試料地下水のsMMOのTCE分解活性を測定する検出装置44と、リアクタ40に供給する酸素、メタン及び栄養塩の供給量を検出装置44の検出信号に基づいて調節する調節弁46とを備えている。

50 【0035】以下に、本地層浄化設備30を使用して、

本発明方法を実施する例を説明する。増殖工程では、メタン資化菌の増殖に必要な酸素、栄養塩及びメタンを溶解・注入装置32からリアクタ40に供給し、メタン資化菌の増殖に必要な酸素、栄養塩及びメタンをリアクタ40の充填層に連続的に供給している。増殖工程の実施中、観測井36から定期的に地下水を採取し、採取した地下水中のsMMOのTCE分解活性を検出装置44により実施例1と同様に検出する。次いで、実施例1と同様にしてMMOのTCE分解活性を求め、求めたTCE分解活性に基づき、予め設定されているTCE分解活性と酸素、メタン及び栄養塩の注入量との相関関係に従って検出装置44より信号を出力し、それにより、調節弁46を調節して、酸素、メタン及び栄養塩の注入量を調整する。例えば、地層の地下水中のsMMOのTCE分解活性が、所定の数値に到達した時点で、増殖工程を終了し、次の分解工程に移行する。

【0036】実施例1及び実施例2では、sMMOのTCE分解活性のモニタリングを行いながら、メタン、酸素及び栄養塩の供給を制御することが特長となっている。すなわち、オンライン分析、現場での簡易分析、または研究所への持ち帰り分析により汚染地層中のsMMOのTCE分解活性を分析し、従来、少なくとも1ヶ月を要したメタン資化菌数の計数値に基づいて間接的に判断していた汚染地層のTCE分解能をほぼオンタイムで、長くとも1日以内には把握することが可能である。これにより、そのTCE分解活性の度合いに応じて、プロセス制御に反映させ、メタン、酸素、栄養塩の注入量の増減、及び、それらの注入停止、注入再開をタイミング良く決定することができる。

【0037】また、従来は、メタン資化菌数を測定することにより、TCE分解能を推測していたが、汚染地層でsMMOのTCE分解活性が発現しているかどうかを実際に把握することはできていなかった。これに対し、本発明方法では、汚染地層のTCE分解能を正確に把握できるので、増殖工程から分解工程への切り換え、或いは分解工程から増殖工程への切り換えを的確に行うことができる。本発明により、汚染地層での増殖工程におけるメタン資化菌のsMMO活性の増加、および分解工程におけるsMMO活性に持続を把握することにより、メタン、酸素及び栄養塩の供給を最適化して浄化コストを削減し、また、浄化期間を短縮できる。

【0038】

【発明の効果】本発明方法は、分解酵素の酸化活性を測定し、分解酵素の有機塩素化合物分解活性と酸化活性と

の相関関係に従って、測定した分解酵素の酸化活性に基づく分解酵素の有機塩素化合物分解活性を算出し、求めた有機塩素化合物分解活性に基づいて資化菌の基質、酸素及び栄養塩の供給量を制御している。よって、本発明方法によれば、汚染地層のTCE分解能を正確にかつ短時間に検出できるので、従来に比べて、汚染地層の状況を正確かつリアルタイム的に認識して、理論的な制御を行うことにより、基質、酸素及び栄養塩の供給を最適化して、浄化コストを削減し、かつ浄化期間を短縮することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明方法の実施例1を実施する地層浄化設備の構成を示す概念図である。

【図2】メタン資化菌の菌数と、sMMO活性と、TCE分解活性との関係を示すグラフである。

【図3】実施例1及び従来方法による資化菌増殖工程と有機塩素化合物分解工程の経過時間の比較を示す図である。

【図4】本発明方法の実施例2を実施する地層浄化設備の構成を示す概念図である。

【図5】sMMO活性とTCE分解活性との関係を示すグラフである。

【図6】メタンの酸化反応の進行を示す式である。

【図7】TCEの分解反応の進行を示す式である。

【符号の説明】

10 実施例1で使用する地層浄化設備

12 溶解・注入装置

14 注入井

16 観測井

18 揚水井

20 曝気塔

22 ポンプ

24 プロア

26 検出装置

28 調節弁

30 実施例2で使用する地層浄化設備

32 溶解・注入装置

34 注入井

36 観測井

38 揚水井

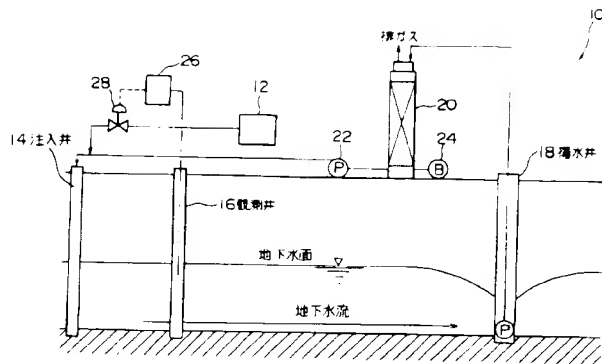
40 リアクタ

42 ポンプ

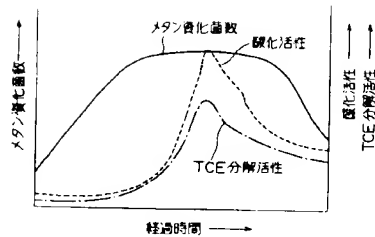
44 検出装置

46 調節弁

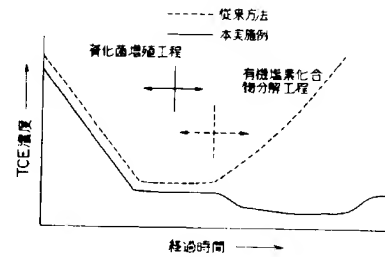
【図1】



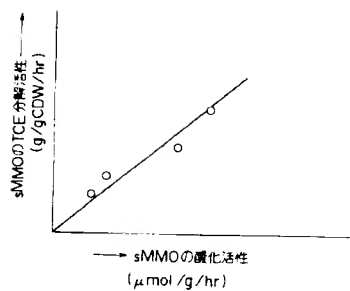
【図2】



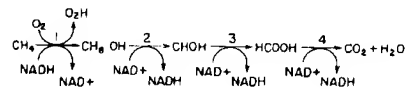
【図3】



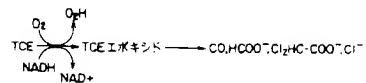
【図5】



【図6】



【図7】



【図4】

